ICS 11.220
B 41

中华人民共和国国家标准

GB/T 35912—2018

猪繁殖与呼吸综合征病毒荧光 RT-PCR 检测方法

Real-time RT-PCR method for detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus

青岛立见诊断技术发展中心
提供下载 www.qdresn.com

2018-02-06 发布

2018-09-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

刮涂层查真伪

前　言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物卫生标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本标准起草单位:中华人民共和国上海出入境检验检疫局、中国农业科学院上海兽医研究所、中华人民共和国深圳出入境检验检疫局、湖南圣湘生物科技有限公司、中国检验检疫科学研究院。

本标准主要起草人:张强、李健、熊炜、童光志、赵和平、李树清、花群义、杨忠苹、李国新、王巧全、王艳、林颖峥、蔡开妹、喻正军、林祥梅、吴绍强。

青岛立见诊断技术发展中心
提供下载 www.qdregen.com

猪繁殖与呼吸综合征病毒荧光 RT-PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了猪繁殖与呼吸综合征病毒荧光 RT-PCR 检测的操作方法。

本标准适用于猪繁殖与呼吸道综合征病毒美洲型毒株核酸检测。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 25172 猪常温精液生产与保存技术规范

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

Real-time RT-PCR：荧光反转录聚合酶链式反应(real-time reverse transcript polymerase chain reaction)

Ct 值：每个反应管内的荧光信号量达到设定的阈值时所经历的循环数(cycle threshold)

RNA：核糖核酸(ribonucleic acid)

Taq 酶：*Taq* DNA 聚合酶(*Taq* DNA polymerase)

TE 缓冲液：Tris-EDTA 缓冲液(Tris-EDTA buffer)

DEPC：焦碳酸二乙酯(diethylpyrocarbonate)

PRRSV：猪繁殖与呼吸综合征病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus)

PBS：磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution)

4 仪器

4.1 荧光 PCR 检测仪。

4.2 高速台式冷冻离心机：可控温至 4 ℃、离心速度可达 12 000 r/min 以上。

4.3 组织研磨器或者研钵。

4.4 普通冰箱：2 ℃～8 ℃。

4.5 超低温冰箱：可控温至－70 ℃以下。

4.6 微量移液器：0.2 μL～2 μL、1 μL～10 μL、10 μL～100 μL、20 μL～200 μL、100 μL～1 000 μL，并配备与移液器匹配的吸头。

4.7 高压灭菌锅。

5 耗材

5.1 1.5 mL 无 RNA 酶离心管。

5.2 0.2 mL PCR 薄壁管或八联管。

6 试剂

6.1 除非另有说明，在检测中使用的试剂均为分析纯，实验室用水应符合 GB/T 6682 的要求。

6.2 Trizol，商品化 RNA 抽提试剂，4 ℃～8 ℃保存。

6.3 氯仿：常温保存。

6.4 异丙醇：使用前预冷至－20 ℃。

6.5 无水乙醇：－20 ℃预冷。

6.6 75%乙醇：无水乙醇和双蒸水配制，－20 ℃预冷。

6.7 DEPC 水：配制见 A.1，也可购买商品化 DEPC 水。

6.8 PBS：配制见 A.2。

6.9 *Taq* 酶及 10 倍 *Taq* 酶反应缓冲液：*Taq* 酶浓度为 5 U/μL，*Taq* 酶反应缓冲液中 Mg^{2+} 浓度为15 mmol/L。

6.10 逆转录酶及 10 倍逆转录酶反应缓冲液：逆转录酶浓度为 50 U/μL，－20 ℃保存，避免反复冻融。

6.11 RNA 酶抑制剂(40 U/μL)：－20 ℃保存，避免反复冻融。

6.12 dNTPs：含 dATP、dGTP、dCTP、dTTP 各 10 mmol/L，－20 ℃保存，避免反复冻融。

6.13 引物和 TaqMan 探针，其序列见附录 B。

6.14 猪繁殖与呼吸道综合征病毒阳性对照样品和阴性对照样品：阳性对照为非感染性体外转录 RNA；阴性对照为健康猪的组织材料。

6.15 内参照质粒：带有人 β-珠蛋白基因的质粒。

7 样品采集和处理

7.1 采样工具

7.1.1 手术刀、剪刀、镊子，经 160 ℃干热灭菌 2 h。

7.1.2 注射器。

7.1.3 一次性无菌采样拭子。

7.1.4 组织研磨器或者研钵，经 160 ℃干热灭菌 2 h。

7.1.5 真空采血管。

7.2 样品采集

7.2.1 血清样品采集：用无菌注射器抽取受检猪静脉血不少于 5 mL，置于无菌离心管内，室温或者 37 ℃倾斜放置自然凝集 20 min～30 min，2 000 r/min～3 000 r/min 离心 10 min，吸取上清液到新的离心管内备用。

7.2.2 公猪精液：按照 GB/T 25172 的方法采集和保存精液。

7.2.3 口腔拭子：大猪使用保定器保定，小猪可以双手保定，用采样拭子蘸取口腔分泌物，放入无菌采样管中。

7.2.4 肺灌洗液：完整摘取肺脏/肺叶，送实验室进行灌洗。

青岛立见检测技术发展中心 提供下载 www.adregen.com

7.2.5 组织样品采集：取肺脏、淋巴结、扁桃体、脾脏等组织，置于无菌离心管内备用。

7.2.6 细胞培养物：细胞培养物反复冻融3次，第3次解冻后，将细胞培养物置于1.5 mL无RNA酶的灭菌离心管内，编号备用。

7.3 样品保存和运输

7.3.1 上述采集的样品可立即用于检测。不能立即检测的样品，在2 ℃～8 ℃下保存应不超过24 h，−20 ℃±5 ℃下应不超过3个月，−70 ℃以下可长期保存。样品运送采用低温保存进行运输，并在规定温度下的保存期内送达。

7.4 样品处理

7.4.1 血清和精液样品无需进行前处理，直接用于核酸提取。

7.4.2 口腔拭子样品：加入500 μL无菌PBS，充分涡旋震荡1 min，反复挤压拭子，弃去拭子后3 000 r/min离心5 min，取上清用于后续的核酸提取。

7.4.3 肺灌洗液：根据肺脏/肺叶的大小，通过肺管加入5 mL～10 mL无菌PBS，反复揉捏，吸取灌洗液，3 000 r/min离心5 min，取上清用于核酸提取。

7.4.4 组织样品：取1 g组织，剪碎，加入2 mL生理盐水进行研磨，制备组织匀浆，8 000 r/min离心5 min，取上清用于后续的核酸提取。

7.4.5 细胞培养物：4 000 r/min，4 ℃离心10 min，取上清用于后续的核酸提取。

8 荧光RT-PCR操作程序

8.1 RNA抽提

8.1.1 在核酸提取区操作。RNA抽提使用Trizol手工提取，也可以使用等效的商品化试剂盒。

8.1.2 取n个灭菌的1.5 mL无RNA酶离心管，其中n为待检样品数＋阳性对照＋阴性对照，对每个离心管进行编号。

8.1.3 每管先加入600 μL Trizol裂解液，再分别加入被检样品、阳性对照、阴性对照各200 μL，颠倒10次混匀，最后加入200 μL氯仿，涡旋震荡5 s，4 ℃条件下12 000 r/min离心15 min。

8.1.4 将上层透明液体(约400 μL)转移到一个新的无RNA酶的离心管中，加入等体积预冷的异丙醇，每个离心管对应编号。

8.1.5 12 000 r/min离心15 min，弃去上清，沿管壁缓缓加入0.8 mL～1 mL 75%乙醇，颠倒3～6次混匀，12 000 r/min离心10 min。反复洗涤两次后，将离心管倒扣于吸水纸上，自然晾干或用移液器移去残液。

8.1.6 加入20 μL DEPC水，轻轻混匀，溶解RNA。提取的RNA应尽快进行反转录扩增或放置于−70 ℃冰箱保存。

8.1.7 提取过程中要注意交叉污染，移液过程每份样品都需要更换吸头；不同样品离心管倒扣在吸水纸上的不同位置。

8.2 荧光PCR检测

8.2.1 反应体系的配制

在试剂配制区进行。设实时荧光PCR反应管数为n，n为待检样品数＋阳性管数＋阴性管数，每个反应的体系见附录C，为了避免移液器取样损失，建议按n＋1个反应进行配制。配制反应液在冰盒中进行。

青岛农业大学诊断技术发展中心 提供下载 www.adregen.com

8.2.2 反应液的分装

将 8.2.1 中配制的荧光 PCR 反应液充分混匀，按照每管 44.8 μL 分装于 0.2 mL 透明 PCR 管内，将 PCR 管置于 96 孔板上，按顺序加样并做好标识，转移至核酸提取区。

8.2.3 加样

在核酸提取区进行。在每个 PCR 反应管内加入 0.2 μL 的内参照质粒，并分别加入 8.1 制备的核酸 5 μL RNA 溶液，盖上盖子，500 r/min～1 000 r/min 离心 30 s。转移至检测区。

8.2.4 上机检测

8.2.4.1 荧光通道设置

在检测区进行。将 8.2.3 中离心后的 PCR 管放入荧光 PCR 检测仪内，设置探针：5′选择 FAM、HEX 和 ROX 三个荧光通道，3′均选择无(None)荧光。

8.2.4.2 循环条件设置与检测

第一阶段，反转录 42 ℃，30 min；
第二阶段，预变性 95 ℃，1 min；
第三阶段，变性 95 ℃/15 s，退火、延伸、荧光采集 60 ℃/30 s，40 个循环；
第四阶段，冷却 25 ℃，10 s。
检测结束后，保存结果，根据收集的荧光曲线和 *Ct* 值判定结果。

9 结果判定

9.1 阈值设定

阈值设定原则根据仪器噪声情况进行调整，以阈值线刚好超过正常阴性样品扩增的最高点为准。

9.2 质量控制

9.2.1 PRRSV 阴性对照：FAM 通道无报告 *Ct* 值或无典型的 S 型扩增曲线，HEX 通道无报告 *Ct* 值或无典型的 S 型扩增曲线，ROX 通道 *Ct* 值≤36 且扩增曲线为典型的 S 型。
9.2.2 PRRSV 阳性对照：FAM 通道 *Ct* 值≤30，HEX 通道 *Ct* 值≤30，ROX 通道 *Ct* 值≤36，且 3 个通道的扩增曲线均为典型的 S 型。
9.2.3 9.2.1 和 9.2.2 要求需在同一次实验中同时满足，否则，本次实验无效，需重新进行。

9.3 结果描述及判定

9.3.1 被检样本检测结果中 FAM 通道 *Ct* 值≤38，HEX 通道 *Ct* 值≤38，且扩增曲线均为典型的 S 曲线，报告为 PRRSV 美洲型变异株核酸阳性；38＜*Ct* 值≤40，判定为可疑，可疑样品应重新检测，如重复后仍然 38＜*Ct* 值≤40，且扩增曲线均为典型的 S 曲线，报告为 PRRSV 美洲型变异株核酸阳性。
9.3.2 被检样本检测结果中 FAM 通道 *Ct* 值≤40，且扩增曲线为典型的 S 型扩增曲线，HEX 通道无 *Ct* 值或者无典型的 S 型扩增曲线，报告为 PRRSV 美洲型经典株核酸阳性。
9.3.3 被检样本检测结果中 FAM 通道和 HEX 通道均无 *Ct* 值或无典型的 S 型扩增曲线，同时 ROX 通道 *Ct* 值≤36 且扩增曲线为典型的 S 曲线，则该样本超过本方法检测灵敏度范围，报告为 PRRSV 美洲型毒株核酸阴性。
9.3.4 被检样本检测结果中 FAM 通道和 HEX 通道均无 *Ct* 值或无典型的 S 型扩增曲线，同时 ROX 通道 *Ct* 值＞36，则该样本的检测结果无效，应查找并排除原因，并对此样本进行重复实验。

附 录 A
（规范性附录）
溶 液 配 制

A.1 DEPC 水配制

每升去离子水中加入 1 mL DEPC，用力摇匀，使 DEPC 充分混匀在水中，37 ℃放置 12 h 以上，再经 121 ℃、15 min 高压灭菌备用。

A.2 磷酸盐缓冲液（0.01 mol/L PBS，pH 7.4）

用 800 mL 蒸馏水溶解 8 g NaCl，0.2 g KCl，1.44 g Na_2HPO_4 和 0.24 g KH_2PO_4。用 HCl 调节溶液的 pH 至 7.4，加水至 1 L。分装后经 121 ℃、15 min 高压灭菌后备用。

青岛立见诊断技术发展中心
提供下载 www.adregen.com

附 录 B
（规范性附录）
引物和探针

引物、探针的名称和序列见表 B.1。

表 B.1 引物、探针的名称与序列

名称	序列
M-qF	5′-TTGCTAGGCCGCAAGTAC-3′
M-qR	5′-ACGCCGGACGACAAATGC-3′
M-P(探针)	5′-FAM-CTGGCCCCTGCCCACCAC-BHQ1-3′
NSP2-qF	5′-CACCGCGTAGAACTGTGACAA-3′
NSP2-qR	5′-TYATATTCCGTYTGTGAGGAC-3′
NSP2-P(探针)	5′-HEX-ACGCTGACGCACCAGGATGAGCCTCT-BHQ1-3′
IC-F	5′-AAGTGCTCGGTGCCTTTAGTG-3′
IC-R	5′-GTCCCATAGACTCACCCTGAAGT-3′
IC-P2(探针)	5′-ROX-CCTGGCTCACCTGGACAACCTCAAG-BHQ2-3′

注：引物和探针可由生物公司合成，用 TE 溶液溶解并稀释至 100 μmol/L 储存浓度，−20 ℃保存备用；根据需要配制成 10 μmol/L 工作液，−20 ℃保存供检测使用。

青岛立见诊断技术发展中心
提供下载 www.ddregen.com

附 录 C
（规范性附录）
荧光 RT-PCR 反应体系

荧光 RT-PCR 反应体系见表 C.1。

表 C.1 荧光 RT-PCR 反应体系

组分	1 个检测反应的加入量
5×RT-PCR buffer	10 μL
M-MLV 反转录酶(200 U/μL)	0.3 μL
Taq DNA 聚合酶(5 U/μL)	1.7 μL
RNA 酶抑制剂(40 U/μL)	0.5 μL
dNTPs (100 mmol/L)	0.4 μL
M-qF(10 μmol/L)	1 μL
M-qR(10 μmol/L)	1 μL
M-P(10 μmol/L)	0.6 μL
NSP2-qF(10 μmol/L)	1 μL
NSP2-qR(10 μmol/L)	1 μL
NSP2-P(10 μmol/L)	0.6 μL
IC-F(10 μmol/L)	0.5 μL
IC-R(10 μmol/L)	0.5 μL
IC-P2(10 μmol/L)	0.5 μL
DEPC 水	25.2 μL
合计	44.8 μL

青岛立见诊断技术发展中心
提供下载 www.adregen.com